

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, C07K 7/08, 13/00 C12N 15/86, C07K 7/06, 7/10 A61K 37/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/03597 (43) Date de publication internationale: 17 février 1994 (17.02.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00772 (22) Date de dépôt international: 28 juillet 1993 (28.07.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/09433 30 juillet 1992 (30.07.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : DUCHESNE, Marc [FR/FR]; 53, rue de Boissy, F-94370 Sucy-en-Brie (FR). SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 53, boulevard de la Libération, F-94300 Vincennes (FR). TOCQUE, Bruno [FR/FR]; 259, boulevard Péraire, F-75017 Paris (FR).		(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhone-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: PEPTIDES INHIBITING RAS PROTEIN ACTIVITY, PREPARATION AND USE THEREOF (54) Titre: PEPTIDES INHIBANT L'ACTIVITE DES PROTEINES RAS, PREPARATION ET UTILISATION (57) Abstract Peptides capable of at least partially inhibiting the transformation activity of activated p21 proteins, their preparation, and pharmaceutical compositions containing them. (57) Abrégé La présente invention concerne des peptides capables d'inhiber au moins partiellement l'activité transformante des protéines p21 activées, leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PEPTIDES INHIBANT L'ACTIVITE DES PROTEINES RAS.
PREPARATION ET UTILISATION

La présente invention concerne de nouvelles séquences peptidiques et nucléotidiques, et leur utilisation pharmaceutique. Plus particulièrement, la
5 présente invention concerne de nouveaux peptides capables d'inhiber au moins partiellement l'activité transformante des protéines ras.

Différents gènes, appelés oncogènes et gènes suppresseurs, sont impliqués dans le contrôle de la division cellulaire. Parmi ceux-ci, les gènes ras, et leurs produits généralement désignés protéines p21, jouent un rôle clé dans le
10 contrôle de la prolifération cellulaire chez tous les organismes eucaryotes où ils ont été recherchés. Notamment, il a été montré que certaines modifications spécifiques de ces protéines leur font perdre leur contrôle normal et les conduisent à devenir oncogénique. Ainsi, un grand nombre de tumeurs humaines ont été associées à la présence de gènes ras modifiés. De même, une
15 surexpression de ces protéines p21 peut conduire à un dérèglement de la prolifération cellulaire. La compréhension du rôle exact de ces protéines p21 dans les cellules, de leur mode de fonctionnement et de leurs caractéristiques constitue donc un enjeu majeur pour la compréhension et l'approche thérapeutique de la cancérogénèse.

20 *In vivo*, on ne connaît pas encore la nature précise des événements responsables de l'activation des protéines p21, et de la transduction du signal qu'elles portent. On sait qu'elles exercent leur fonction en oscillant entre deux états conformationnels : une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. L'activité de ces protéines est donc contrôlée par les facteurs qui
25 régissent l'équilibre entre ces deux formes, c'est-à-dire la transition p21-GDP -> p21-GTP et inversement.

Concernant l'activation des complexes p21-GDP, des travaux récents rapportent des situations physiologiques au cours desquelles la proportion de protéines ras liées au GTP augmente dans la cellule. Il s'agit de l'activation des
30 lymphocytes T et de la stimulation des fibroblastes 3T3 par des facteurs de croissance dont l'EGF et le PDGF. Cette augmentation de la proportion de p21-GTP peut s'expliquer au moins en partie par l'action d'une protéine jouant un rôle analogue à celui d'un récepteur pour les protéines G de transduction. A cet

égard, certaines protéines capables de promouvoir l'échange du GDP sur les protéines p21 ont été identifiées, à partir de cerveau de boeuf (West et coll., FEBS Lett. 259 (1990) 245) et de rat (Wolfman et Macara, Science 248 (1990) 67). La localisation cellulaire distincte de ces facteurs, et les conditions expérimentales très différentes dans lesquelles ils ont été obtenus laissent supposer qu'il s'agit de protéines différentes. Elles sont aussi actives sur les protéines ras normales que sur celles qui sont oncogéniques. Ces activités ont été regroupées sous le terme de GEF : Facteur d'Echange des nucléotides Guanidiques.

10 Concernant l'inactivation des complexes p21-GTP, une protéine cytosolique ayant le pouvoir d'accélérer très fortement l'hydrolyse du GTP lié à la protéine p21 a été mise en évidence (Trahey et Mc Cormick, Science 238 (1987) 542). Cette protéine, dénommée GAP, interagit avec les protéines p21 de manière catalytique et multiplie par 100 à 200 la vitesse d'hydrolyse du GTP mesurée *in vitro* pour la protéine p21 normale. Différents travaux ont montré que le domaine catalytique de cette protéine de 1044 acides aminés environ était situé dans la région carboxy-terminale (résidus 702-1044), et que cette région était responsable de l'interaction de la protéine GAP avec les protéines p21 (Cf WO91/02749).

20 Cependant, le rôle de cette protéine GAP n'a pas été jusqu'à présent clairement élucidé. En particulier, les éléments et les facteurs permettant la transduction des signaux d'activation des protéines p21 à la cellule ne sont pas connus. La présente invention résulte de la mise en évidence par la demanderesse que la protéine GAP ne constitue pas simplement un régulateur ayant pour seul rôle de désactiver la p21 en la faisant repasser à l'état inactif par suite de l'hydrolyse du GTP, mais qu'elle constitue également l'effecteur des protéines p21 déclenchant la réponse cellulaire. La présente invention résulte plus particulièrement de l'identification et de la caractérisation de régions particulières (dites régions effectrices) de la protéine GAP impliquées dans la transduction des signaux d'activation des protéines p21. La mise en évidence de l'existence d'une telle région et sa caractérisation permettent de préparer de nouveaux peptides utilisables pharmaceutiquement.

Un premier objet de l'invention concerne donc des peptides capables d'inhiber au moins partiellement l'activité transformante des protéines p21 activées. Il est entendu que le terme protéine p21 désigne tout produit d'expression d'un gène ras normal ou oncogénique.

5 Plus particulièrement, l'invention a pour objet les peptides capables d'inhiber au moins partiellement l'activité transformante des complexes p21-GTP-GAP. On sait de plus que les protéines p21 sont nécessaires à l'expression du pouvoir transformant d'oncogènes agissant en amont, comme src, HER1, HER2, etc. De ce fait, les peptides de l'invention et toute composition
10 pharmaceutique les contenant sont également utiles pour traiter les tumeurs présentant ces gènes activés.

Préférentiellement, les peptides de l'invention sont des dérivés de la protéine GAP.

Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute
15 molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique et conservant la capacité d'inhibition recherchée. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui
20 d'augmenter l'affinité du peptide pour son site d'interaction, celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases ou d'améliorer son passage à travers les membranes cellulaires, celui d'augmenter son efficacité thérapeutique ou de réduire ses effets secondaires, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques.

25 En tant que peptide dérivé de la protéine GAP, on peut citer notamment tout peptide capable de lier la protéine p21, éventuellement complexée au GTP, mais portant une région effectrice rendue non fonctionnelle. De tels peptides peuvent être obtenus par délétion, mutation ou disruption de cette région effectrice sur la protéine GAP.

30 Plus préférentiellement, les peptides de l'invention comprennent tout ou partie de la séquence peptidique SEQ ID n° 2 ou d'un dérivé de celle-ci.

Le terme dérivé a la même signification que précédemment.

Les peptides de l'invention peuvent ainsi avoir la structure du peptide de séquence SEQ ID n° 2, d'un fragment de celui-ci, ou une structure dérivée de ceux-ci (par exemple un peptide incorporant le peptide SEQ ID n° 2). De tels peptides peuvent être générés de différentes façons. En particulier, ils peuvent être synthétisés par voie chimique, sur la base de la séquence SEQ ID n° 2, en utilisant les synthétiseurs peptidiques connus de l'homme du métier. Ils peuvent également être synthétisés par voie génétique, par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique codant pour le peptide recherché, éventuellement suivie de modifications chimiques ou enzymatiques. Dans le cas d'une synthèse par voie génétique, la séquence nucléotidique peut être préparée chimiquement en utilisant un synthétiseur d'oligonucléotides, sur la base de la séquence peptidique donnée dans la présente demande et du code génétique. La séquence nucléotidique peut également être préparée à partir de la séquence nucléotidique donnée dans la présente demande (SEQ ID n° 1), par coupures enzymatiques, ligature, clonage, etc, selon les techniques connues de l'homme du métier. Ces peptides peuvent également être modifiés par l'ajout de séquences leur permettant une localisation cellulaire précise. En particulier, des séquences de type CAAX où C est une cystéine, A un acide aminé aliphatique et X un acide aminé quelconque, permettant de déterminer si un peptide est ou non modifié post-traductionnellement par une farnésyl transférase cellulaire peuvent être ajoutées (Cancer Cells vol3(9) 1991 331).

La présente invention permet donc de générer des peptides dérivés de la protéine GAP et, plus particulièrement, de la séquence SEQ ID n° 2, présentant des propriétés biologiques intéressantes en vue d'une utilisation pharmaceutique. L'activité biologique de ces différents peptides de l'invention peut être évaluée selon différents tests décrits dans les exemples, et notamment par un test de maturation d'oocytes.

D'autres peptides selon l'invention sont les peptides capables d'entrer en compétition avec les peptides ci-dessus définis pour l'interaction avec leur cible cellulaire. De tels peptides peuvent être synthétisés notamment sur la base de la séquence du peptide considéré, et leur capacité à entrer en compétition avec les peptides ci-dessus définis pour l'interaction avec leur cible cellulaire peut être déterminée comme décrit dans les exemples.

A titre d'exemples de peptides selon l'invention, on peut citer les peptides ayant la séquence d'acides aminés suivantes :

- peptide ayant la séquence SEQ ID n° 2;
- peptide PVEDRRRVRAI (positions 5-15 sur la séquence SEQ ID n° 2)
- 5 - peptide EISF (positions 26-29 sur la séquence SEQ ID n° 2)
- peptide EDGWM (positions 42-46 sur la séquence SEQ ID n° 2)
- protéine GAP portant une région effectrice rendue non fonctionnelle,
- polypeptides P4-P9 (SEQ ID n° 3-8) décrits dans l'exemple 2,
- peptides compétiteurs des peptides ci-dessus.

10 L'invention fournit également des composés non peptidiques ou non exclusivement peptidiques utilisables pharmaceutiquement. Il est en effet possible, à partir des motifs protéiques actifs décrits dans la présente demande, de réaliser des molécules inhibitrices de la voie de signalisation dépendante de la protéine GAP non exclusivement peptidiques et compatibles avec une
15 utilisation pharmaceutique.

La présente invention a également pour objet toute séquence nucléotidique codant pour un peptide selon l'invention. Il peut s'agir en particulier d'une séquence comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1 ou d'une séquence dérivée de celle-ci. Par séquence dérivée, on entend au sens
20 de la présente invention toute séquence hybridant avec la séquence SEQ ID n° 1 ou avec un fragment de celle-ci et codant pour un peptide selon l'invention, ainsi que les séquences résultant de ces dernières par dégénérescence du code génétique. Un exemple de séquence de l'invention hybridant avec la séquence SEQ ID n° 1 est représenté sur la séquence SEQ ID n° 3. Les séquences de
25 l'invention peuvent être utilisées pour la production des peptides de l'invention. Dans ce cas, la partie codant pour ledit peptide est généralement placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, séquence "leader" de sécrétion, etc) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. Par ailleurs, les séquences
30 nucléotidiques de l'invention peuvent faire partie d'un vecteur, qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à répllication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à répllication autonome chez l'hôte choisi. S'agissant des vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés par exemple en utilisant des séquences homologues à

certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur. Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des peptides de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui
5 conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma*
10 ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

Les séquences nucléotidiques de la présente invention sont également utilisables dans le domaine pharmaceutique, soit dans le cadre d'une thérapie génique, soit pour la détection, par des expériences d'hybridation, de
15 l'expression de gènes GAP dans des échantillons biologiques, soit pour préparer des oligonucléotides antisens. Concernant la thérapie génique, les séquences de l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs tels que des vecteurs rétroviraux ou des vecteurs adénoviraux, permettant leur administration *in vivo* (Médecine et Sciences 7 (1991) 705).

20 Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces séquences peuvent être obtenues soit par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc, banque d'ADN génomique), soit par synthèse
25 chimique, soit par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

Les produits de la présente invention peuvent être utilisés dans le domaine thérapeutique : en particulier, les peptides de l'invention étant capables de moduler l'activité des protéines ras, ils permettent d'intervenir dans
30 le processus de développement des cancers, et notamment, ils peuvent inhiber l'activité des oncogènes dont l'activité transformante passe par une interaction p21-GAP fonctionnelle. De nombreux cancers ont en effet été associés à la présence de protéines ras oncogéniques. Parmi les cancers renfermant le plus souvent des gènes ras mutés, on peut citer notamment les adénocarcinomes du

pancréas, dont 90% ont un oncogène Ki-ras muté sur le douzième codon (Almoguera et coll., Cell 53 (1988) 549), les adénocarcinomes du colon et les cancers de la thyroïde (50%), ou les carcinomes du poumon et les leucémies myéloïdes (30%, Bos, J.L. Cancer Res. 49 (1989) 4682).

5 L'invention a donc également pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un peptide et/ou un oligonucléotide antisens et/ou une séquence nucléique selon la présente invention. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale,
10 intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc. Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels
15 sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses de principe actif (peptide, séquence nucléique ou vecteur) utilisées pour l'administration peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du
20 mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, concernant les virus recombinants selon l'invention, ceux-ci sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond
25 au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

30 Les compositions pharmaceutiques sont plus particulièrement destinées à une utilisation dans le traitements des cancers. Plus particulièrement, les compositions pharmaceutiques comprennent au moins un virus dans lequel est incorporé au moins une séquence nucléotidique telle que décrite ci-avant.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

- 5 Figure 1 : Mise en évidence de la région effectrice de la protéine GAP.
Figure 2 : Profil antigénique du peptide SEQ ID n° 2 criblé en recouvrement séquentiel par l'anticorps Ac200.
Figure 3 : Effet des peptides de l'invention sur la maturation des oeufs de xénope induite par p21 Ras Lys12, l'insuline ou la progestérone.

10

Techniques générales de clonage

- Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels
15 d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc, sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular
20 Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

- Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées
25 selon les recommandations des fournisseurs.

- Les plasmides de type pBR322, pUC, lgt11, pGEX 2T et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale.

- Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un
30 mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les

spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

- 5 La mutagenèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. **13** (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

- L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science **230** (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. **155** (1987) 335-350]
10 est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

- La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74** (1977) 5463-5467] en
15 utilisant le kit distribué par Amersham.

Pour les expériences d'hybridation, les conditions de stringence normales sont généralement les suivantes : hybridation : 3 x SCC en présence de 5 x Denhart's à 65°C; lavage : 0,5 x SSC à 65 °C.

Exemple 1 : Mise en évidence des régions effectrices

- 20 L'existence de régions effectrices au sein de la protéine GAP a été démontrée par la mise en évidence que des anticorps anti-GAP étaient capables de bloquer l'activité transformante de ras (E.1.1.) alors que ces mêmes anticorps ne modifiaient pas l'interaction GAP-ras (E.1.2.).

E.1.1. Inhibition de la fonction ras par des anticorps anti-GAP.

- 25 Les anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine GAP ont été obtenus auprès de M. Thang (Inserm U245, Hopital St Antoine, Paris). Ces anticorps ont été utilisés pour mettre en évidence le rôle de l'interaction GAP-p21 et, plus précisément, pour montrer l'influence d'une inhibition de cette interaction sur la maturation d'oeufs de xénopes induite par ras.

- 30 Des grenouilles *Xenopus laevis* ont été obtenues auprès du CNRS (Montpellier, France). Les grenouilles sont anesthésiées dans l'eau glacée, et des fragments d'ovaires sont prélevés chirurgicalement et transférés dans un milieu

Barth modifié (Hirai et al., Dev. Biol. 100 (1984) 214). Les oocytes au stade VI sont récupérés en agitant les agrégats d'oocytes pendant 2 heures à température ambiante en présence de 2 mg/ml de collagénase (Sigma). Pour l'analyse de la maturation induite par ras, 40 nl de la protéine dans du milieu Barth modifié sont introduits dans le cytoplasme des oocytes par microinjection, soit seuls, soit en présence des anticorps anti-GAP à différentes concentrations. Pour l'analyse de la maturation induite par les hormones, les oocytes sont incubés en présence d'insuline (10 µg/ml) et de chlorure de zinc (10 µM) (insuline pancréatique bovine, Sigma) ou de progestérone (1 µM). Les oocytes sont conservés à 20°C dans du milieu Barth modifié, et le % de rupture de vésicule germinale (GVBD) est déterminé après 18 heures d'incubation, par dissection des oocytes préalablement fixés en présence de 5% d'acide trichloroacétique. Les résultats sont exprimés par le % de GVBD sur des groupes d'oocytes.

Les résultats obtenus montrent que certains anticorps anti-GAP sont capables d'inhiber l'activité transformante de la protéine ras. L'anticorps Ac200 a été utilisé dans la suite de l'étude.

E.1.2. Absence d'effet de l'anticorps Ac200 sur l'interaction GAP-p21

L'interaction entre GAP et le complexe p21-GTP est déterminée selon le protocole suivant. La protéine Ha-ras p21 normale (Rey et al., Mol. Cell. Biol. 9 (1989) 3904) est équilibrée avec un excès de (γ -³²P) GTP (3000 Ci/mmol, Dupont, NEN Research Products, Boston, Mass) dans un tampon Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), 100 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM dithiothréitol, 1 mM MgCl₂ et 50 mg/ml de sérum-albumine bovine, pendant 30 minutes à 30 °C. L'incubation est arrêtée en appliquant la solution refroidie sur une colonne PD10 (Pharmacia) équilibrée par un tampon Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), 10 mM dithiothréitol, 10 mM MgCl₂, 1 mM fluorure de phénylméthylsulfonyl, pour éliminer les nucléotides libres. La réaction GTPase est une variante de celle décrite par Cassel et Selinger (Biochim. Biophys. Acta 452 (1976) 538). La réaction est commencée par ajout de 10 µl (15 µg) du cytosol obtenu par sonication de souches d'*E.coli* exprimant le GAP (Cf exemple E.2.1. ci-dessous pour la production de GAP), à 1 pmol de Ha-ras p21-(γ -³²P) GTP dans du tampon Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM, dithiothréitol 10 mM, MgCl₂ 5mM, GTP 100 µM, BSA 50 µg/ml, pour obtenir un volume final de 50 µl. La réaction est

réalisée pendant 3 minutes à 30°C et arrêtée sur la glace par addition de 950 µl d'acide phosphorique 20 mM (pH 2,3) contenant 5% (w/v) de charbon activé. Après centrifugation à 1800 g, la radioactivité est mesurée dans des échantillons de 200 µl du surnageant. Les résultats sont présentés ci-dessous.

5	<u>Produit testé</u>	<u>Activité relative GAP</u>
	Aucun	100
	Ac200	100
	[275-351]GAP	100
	Ac Y13-259	5

- 10 Ils montrent que l'anticorps Ac200 ne modifie pas l'interaction GAP-p21. Le même essai réalisé avec le fragment 273-351 de GAP (SEQ ID n° 1) démontre également que ce polypeptide ne modifie pas l'interaction fonctionnelle GAP-p21.

Exemple 2 : Caractérisation de la région effectrice

- 15 E.2.1. Mise en évidence d'une région de 80 aa environ par fragmentation de GAP, production de ces fragments de GAP sous forme de fusion GST, et réactivité vis-à-vis de l'anticorps Ac200 neutralisant.

La séquence d'ADN codant pour la protéine GAP a été fragmentée par digestion enzymatique, et les fragments obtenus ont été séparés par
 20 électroélution et mis sous forme de fragments BamHI-EcoRI. Ces fragments ont ensuite été exprimées dans la souche d'*E.coli* TG1 sous forme de protéines de fusion avec la glutathion S-transférase (GST) selon la technique décrite par Smith et Johnson (Gene 67 (1988) 31). Pour cela, les différents fragments d'ADN obtenus ont été insérés dans les sites BamHI-EcoRI du vecteur pGEX 2T
 25 (Pharmacia), en 3' et en phase d'un ADN codant pour la GST. Les vecteurs ainsi obtenus sont ensuite utilisés pour transformer la souche *E.coli* TG1. Les cellules ainsi transformées sont pré-cultivées une nuit à 37°C, diluées au 1/10e dans du milieu LB, ajoutées d'IPTG pour induire l'expression (2 heures, 25°C), puis cultivées 21 heures environ à 25°C. Les cellules sont ensuite lysées, et les
 30 protéines de fusions produites sont purifiées par affinité sur colonne Agarose-GSH. Pour cela, le lysat bactérien est incubé en présence du gel (préparé et

équilibré avec le tampon de lyse) pendant 15 min à 4°C. Après 3 lavages avec un tampon Tris-HCl pH 7,4, les protéines sont éluées en présence d'un tampon Tris-HCl pH 7,7 contenant un excès de GSH. Le surnageant est récolté et centrifugé.

5 Les fragments ainsi obtenus sont testés en fonction de leur reconnaissance par l'anticorps Ac200. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 1. Ils montrent que la région effectrice de la protéine GAP est située entre les résidus 275 et 350 environ.

10 E.2.2. Identification plus précise par "Epitope Scanning"

La technique "d'epitope scanning" est basée sur le principe qu'un anticorps donné peut réagir avec des peptides de 5 à 15 acides aminés. De ce fait, l'identification d'épitopes séquentiels peut être obtenue en préparant un jeu complet de peptides recouvrants, de 5-15 acides aminés, correspondants à la 15 séquence complète de l'antigène considéré. Cette technique a été utilisée pour déterminer les épitopes fonctionnels du fragment de GAP mis en évidence à l'exemple E.2.1. ci-dessus. Pour cela, la totalité du fragment a été explorée par recouvrements séquentiels, par synthèse d'un décapeptide tous les 2 acides aminés.

20 a) Synthèse des peptides recouvrants.

35 peptides couvrant la totalité de la séquence SEQ ID n° 1 ont été synthétisés chimiquement. La synthèse a été effectuée en double, sur 2 supports indépendants, par la méthode Fmoc/t-butyl sur phase solide (kit Cambridge 25 Research Biochemicals).

b) Mise en évidence des épitopes fonctionnels.

Les épitopes fonctionnels reconnus par l'anticorps Ac200 ont été révélés en test ELISA par un anticorps de lapin anti-souris couplé à la peroxydase. Le substrat chromogénique de l'enzyme utilisé est l'amino-di-(3-ethylbenzothiazodine sulfonate) (ABTS). 30

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 2. Les épitopes reconnus par cet anticorps sont les suivants :

- PVEDRRRVRAI

(P1)

- EISF (P2)

- EDGWM (P3)

Il est entendu que d'autres régions fonctionnelles de la séquence SEQ ID n° 1 peuvent être mises en évidence en utilisant d'autres anticorps anti-GAP.

5 Sur la base de ces résultats et en utilisant la même technique de synthèse chimique, les peptides suivants ont été synthétisés :

- APPEPVEDRRRVRAILPYTKVPDTDEISFLKGD (P4)

- WMWVTNLRTD (P5)

- ISFLKGDMFIVHNELEDGWMWVTNLRTD (P6)

10 - VTNLRTDEQGLIVEDLVEEVGREEDPHEGKI (P7)

- PPEPVEDRRRVRAILPYTKVPDTDEISFLKGDMFIVHNELEDGWMW
VTNLRTD (P8)

- Peptide SEQ ID n° 3 (P9)

Exemple 3 : Caractérisation biologique

15 E.3.1. L'activité biologique des peptides de l'invention a été étudiée en mesurant leur effet sur la maturation d'oeufs de xénopes induite par p21 ras Lys12, par l'insuline ou par la progestérone.

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple E.1.1. ci-dessus. L'activité est mesurée par microinjection dans le cytoplasme des oocytes
20 de 40 nl de la protéine p21 ras dans du milieu Barth modifié, soit seuls, soit en présence des différents peptides de l'invention à des concentrations variables. Les résultats sont exprimés par le % de GVBD sur des groupes d'oocytes. Les résultats sont présentés sur la figure 3.

Ces résultats montrent clairement que les peptides de l'invention,
25 notamment le peptide SEQ ID n° 1 et le peptide (P5), sont capables d'inhiber l'activité transformante de la protéine ras. Un fragment de longueur identique ([768-860] PLC γ) préparé par les mêmes techniques à partir de la phospholipase C type γ humaine ne présente pas l'activité du peptide de l'invention.

E.3.2. Le peptide P9 a été purifié sous la forme d'une protéine de fusion à
30 la GST selon le protocole décrit dans l'exemple E.2.1., puis séparé de la GST après clivage protéolytique à la thrombine. Le peptide P9 ainsi obtenu a ensuite été testé sur la maturation d'oeufs de xénopes dans les conditions de l'exemple

E.3.1. Les résultats obtenus montrent que le peptide P9 bloque complètement la maturation des ovocytes.

L'activité de P9 a ensuite été évaluée dans un test de formation de foyers de cellules transformées. Les cellules cancéreuses ont en effet la propriété de former des foyers de transformation, et notamment les fibroblastes NIH 3T3 exprimant un ras oncogénique. Les cellules NIH 3T3 ont été cultivées dans du milieu DMEM (milieu Dulbecco modifié Eagle) contenant 10 % de sérum de veau fœtal, à 37 °C, dans un environnement humide contenant 5 % CO₂. Les plasmides pSV2-GAP et pSV2-P9 ont été construits en insérant les séquences nucléotidiques codant pour GAP et pour P9 (SEQ ID n° 3) dans le vecteur SV2. Les cellules NIH 3T3 ont été cotransfectées avec un ras oncogénique Ha-ras Val12, les plasmides indiqués dans le tableau, et un excès de 10 fois du gène de résistance à la néomycine, par la technique de transfection aux lipides cationiques (Schweighoffer et al., Science 256 (1992) 825). La même quantité d'ADN total est transfectée pour chaque boîte. 24 heures après la transfection, les cellules transfectées provenant de chaque boîte de pétri (100 mm) sont divisées dans un rapport 1 à 10 et cultivées dans le même milieu mais en présence de G418 (Gibco/BRL) à 0,4 mg / ml de milieu. Le nombre de foyers de transformation obtenu par µg d'ADN transfecté est comptabilisé après 14 jours de culture. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant. Ils représentent la moyenne de quatre essais indépendants.

Plasmides transfectés	Nombre de foyers par µg d'ADN transfecté
Ha-Ras Val 12	110
Ha-Ras Val 12 + pSV2-GAP	120
Ha-Ras Val 12 + pSV2-P9	35

Ces résultats montrent clairement que les peptides de l'invention (notamment le peptide P9) sont capables de diminuer très fortement le pouvoir transformant d'un gène ras oncogénique.

E.3.3. Activité antitumorale in vivo

a) Préparation d'un virus recombinant comprenant une séquence nucléique selon l'invention.

Les virus recombinants défectifs de l'invention peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un virus défectif et un plasmide portant entre autre la
5 séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-avant (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Graham, EMBO J. 3(12) (1984) 2917). La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits virus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome du virus
10 défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation d'adénovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). A titre d'exemple de lignée utilisable
15 pour la préparation de rétrovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée CRIP (Danos et Mulligan, PNAS 85 (1988) 6460).

Ensuite, les virus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

20 La séquence SEQ ID n° 3 codant pour le peptide P9 a été clonée dans un plasmide néo sous contrôle du promoteur précoce de SV40. La cassette Promoteur SV40-SEQ ID n° 3 a ensuite été clonée dans un vecteur rétroviral de type Moloney (Palmer et al., PNAS 84 (1987) 1055). Un vecteur contrôle a également été construit, dans lequel le fragment a été inséré dans l'orientation
25 antisens.

Les cellules amphotrophiques GP+envAm12 ont été transfectées avec les vecteurs rétroviraux décrits ci-dessus par la technique au phosphate de calcium (Markowitz et al., Virology 167 (1988) 400; Graham et al., Virology 52 (1973) 456). 48 heures après la transfection, les cellules transfectées sont repiquées dans
30 un milieu contenant du G418 (Gibco, BRL) à la concentration de 0,4 mg/ml. Deux semaines plus tard, les colonies résistantes au G418 sont cultivées en grande quantité. Les cellules transfectées présentant un titre élevé en virus sont cocultivées avec les cellules ecotropiques d'emballage Psi2 afin d'augmenter le titre viral (Palmer et al., PNAS 84 (1987) 1055).

Les virus recombinants ainsi produits sont isolés par les techniques classiques de biologie moléculaire.

b) Activité antitumorale in vivo

5

Un modèle de tumeur pulmonaire chez la souris a été mis au point selon la technique décrite par Mc Lemoire et al (Cancer Res. 47 (1987) 5132). Pour cela, les souris reçoivent en intratrachéal 10^5 cellules H460a. Aux jours 4, 5 et 6, les souris ayant reçu la tumeur sont traitées par la même voie intratrachéale avec 10 0,1 ml de suspension virale obtenue ci-dessus (environ 5.10^6 cpu/ml) contenant 5 µg/ml de protamine. 30 jours après l'inoculation de la tumeur, les souris sont analysées pour la présence de tumeurs, dont le volume est approximé selon la technique décrite par Mc Lemoire et al précitée. Les animaux traités par le virus P9 ne présentent pas de tumeurs mesurables, ou seulement des tumeurs de très 15 petite taille. En revanche, les animaux traités par le même titre viral du virus P9 antisens sont indistinguables des animaux contrôle n'ayant reçu que la tumeur.

Ces résultats montrent clairement que les séquences de l'invention, notamment sous forme de vecteurs viraux, peuvent être utilisées in vivo pour le traitement des cancers.

20

Il est entendu que l'homme du métier peut utiliser d'autres virus pour le transfert des peptides de l'invention in vivo. Notamment, il peut s'agir d'adénovirus, de virus adéno-associés, du virus de l'herpès, etc. Des vecteurs dérivés de ces virus ont été décrits dans l'art antérieur et la construction de virus 25 selon l'invention peut être effectuée par l'homme du métier sur la base de ses connaissances générales (voir notamment Akli et al., Nature Genetics 3 (1993) 224; Stratford-Perricaudet et al., Human Gene Therapy 1 (1990) 241; EP 185 573, Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; WO 91/1808; EP 243204).

LISTE DE SEQUENCES**(1) INFORMATION GENERALE:**

5

(i) DEPOSANT:**(A) NOM:** RHONE-POULENC RORER S.A.**(B) RUE:** 20, avenue Raymond ARON**(C) VILLE:** ANTONY10 **(E) PAYS:** FRANCE**(F) CODE POSTAL:** 92165**(ii) TITRE DE L' INVENTION:** PEPTIDES INHIBANT L'ACTIVITE DES PROTEINES RAS,
PREPARATION ET UTILISATION

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8**(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:**20 **(A) TYPE DE SUPPORT:** Tape**(B) ORDINATEUR:** IBM PC compatible**(C) SYSTEME D' EXPLOITATION:** PC-DOS/MS-DOS**(D) LOGICIEL:** PatentIn Release #1.0; Version #1.25 (OEB)25 **(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:****(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:****(A) LONGUEUR:** 234 paires de bases**(B) TYPE:** acide nucléique30 **(C) NOMBRE DE BRINS:** double**(D) CONFIGURATION:** linéaire**(ii) TYPE DE MOLECULE:** ADNc**(iii) HYPOTHETIQUE:** NON35 **(iii) ANTI-SENS:** NON**(v) TYPE DU FRAGMENT:** interne**(vi) ORIGINE:****(A) ORGANISME:** Homo sapiens40 **(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:****(A) NOM/CLE:** CDS**(B) EMPLACEMENT:** 1..234**(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:****(D) AUTRES INFORMATIONS :** Fragment 273-351 du gène GAP

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

5 CCT TAC ACA AAA GTA CCA GAC ACT GAT GAA ATA AGT TTC TTA AAA GGA 96
 Pro Tyr Thr Lys Val Pro Asp Thr Asp Glu Ile Ser Phe Leu Lys Gly
 20 25 30
 10 GAT ATG TTC ATT GTT CAT AAT GAA TTA GAA GAT GGA TGG ATG TGG GTT 144
 Asp Met Phe Ile Val His Asn Glu Leu Glu Asp Gly Trp Met Trp Val
 35 40 45
 15 ACA AAT TTA AGA ACA GAT GAA CAA GGC CTT ATT GTT GAA GAC CTA GTA 192
 Thr Asn Leu Arg Thr Asp Glu Gln Gly Leu Ile Val Glu Asp Leu Val
 50 55 60
 20 GAA GAG GTG GGC CGG GAA GAA GAT CCA CAT GAA GGA AAA ATA 234
 Glu Glu Val Gly Arg Glu Glu Asp Pro His Glu Gly Lys Ile
 65 70 75

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

25 (A) LONGUEUR: 78 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

30 Ala Pro Pro Glu Pro Val Glu Asp Arg Arg Arg Val Arg Ala Ile Leu
 1 5 10 15
 35 Pro Tyr Thr Lys Val Pro Asp Thr Asp Glu Ile Ser Phe Leu Lys Gly
 20 25 30
 Asp Met Phe Ile Val His Asn Glu Leu Glu Asp Gly Trp Met Trp Val
 35 40 45
 40 Thr Asn Leu Arg Thr Asp Glu Gln Gly Leu Ile Val Glu Asp Leu Val
 50 55 60
 45 Glu Glu Val Gly Arg Glu Glu Asp Pro His Glu Gly Lys Ile
 65 70 75

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1548 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

5

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
 (iii) ANTI-SENS: NON
 (v) TYPE DU FRAGMENT: interne

10

- (vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Homo sapiens

- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

15

- (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..1548
 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 (D) AUTRES INFORMATIONS : Fragment 385-1933 du gène GAP

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

20

GCGCGCGGTTTCCCTCTGCCCCCTGCCCTTACCTGCCCTTTGCGGGCGGGCTCGGCACAGTGGACGAAGGTGACCTCTCTCGATGG
 G G C F P P L P P P P Y L P P L G A G L C T V D E G D S L D C
 ACCAGAATACGAGGAGGAAGAGGTGGCCATACCGTTGACCCCTCTCCAATAACAGTGGTATCACGGAAACTTCACAGAAGCATACGAGAACAACCG
 P E Y E E E E V A I P L T A P P T N Q W Y H G K L D R T I A E E R
 CTCAGCGAGGACGGAAGTCTGGCAGTTATCTTATAAGAGACAGTGATCGGAGCCGAGGCTCTTTGTACTTTTCATTTCTAGCCAGATGAATGTTGTCA
 L R Q A G K S G S Y L I R E S D R R P G S F V L S F L S Q M N V V N
 ACCATTTTACGATTATTCGTATGCTGGAGATTACTACATTCGTGCAAGACGTTTTTCTTCACTGTCAGACCTAATACGTTATTACAGTCATGTTTCTTG
 H F R I I A M C G D Y Y I G C R R E S S L S D L I G Y Y S H V S C
 TTTCCTTAAAGGAGAAAAATTACTTTACCCAGTTGCCACCAGAGCCAGTAGAAGATAGAAGCGGTGTACGAGCTATTCTACCTTACACAAAAGTACCA
 L L K G E K L L Y P V A P P E R V E D R R R V R A I L P Y T K V P
 GACACTGATGAAATAAGTTTCTTAAAGGAGATATGTTCAATTGTTTCATAATGAATTAGAAGATGGATGGATGTGGGTTACAAATTTAAGAACAGATGAAC
 D T D E I S F L K G D M F I V H H E L E D G W M W V T N L R T D E Q
 AAGCCCTTATGTTGAAGACCTAGTAGAAGAGGTGGCGCGGAAGAAGATCCACATGAAGGAAAAATATGGTTCCATGGGAAGATTTCCAAACAGGAACG
 G L I V E D L V E E V G R E E D P H E G K I W F H G K I S K Q E A
 TTATAATTTACTAATGACAGTTGCTCAAGTCTGCAAGTTTCTTGTGAGGCCCTCAGATAATACTCTCGCGATTATTCAGTTTATTTCCGGACCAATGAA
 Y N L L M T V G Q V C S F L V R P S D N T P G D Y S L Y F R T N E
 AATATTCAGCGATTAAAAATATGTTCAACGCCCAACAATCAGTTTATGATGGGAGGCCGTATTATAACAGCATTGGGGACATCATAGATCACTATCGAA
 N I Q R F K I C P T P N N O F M M G C R Y Y N S I G D I I D H Y R K
 AAGAACAGATTGTTGAAGGATATTATCTTAAGGAACCTGTACCAATGCAGGATCAAGAAACAAGTACTCAATGACACAGTGGATGCCAAGGAAATCTATAA
 E Q I V E G Y Y L K E P V P M Q D Q E Q V L N D T V D G K E I Y N

TACCATCCGTCGTAACAAAGGATCCCTTTTATAAAACATTGTTAAGAAAGGTTATCTTCTGAAAAAGCCAAAGGAAACGTTGCAAAAATTTATAT
 T I R R K T K D A F Y K H I V K K G Y L L K K G K G K R W K N L Y

TTTATCTTAGAGGGTAGTGATGCCAACTTATTTATTTTGAAGCGAAAAAGGAGCTACCAAAACCAAAAGCATTATAGATCTCAGTGTATGTTCTGCT
 F I L E G S D A Q L I Y F E S E K R A T K P K G L I D L S V C S V Y

ATGTCGTTCAATGATAGTCTCTTTGCCAGGCCAACTGTTTTCAGATAGTACTTTCAGCACTTTAGTGAAGAACATTACATCTTTACTTTGCAGGAGAAAC
 V V H D S L F G R P N C F Q I V V Q H F S E E H Y I F Y F A G E T

TCCAGAACAAGCAGGATTCGATGAAGGCTCTCCAGCCATTTTCCAATTTACGCAAAAGTAGTCCAGGGACATCCAATAAACGCCCTTCGTCAGGTCAGC
 P E Q A E D W M K G L Q A F C N L R K S S P G T S N K R L R Q V S

AGCCTTGTTTTACATATTGAAGAAGCCCAATAAAGTCCAGTAAACATTTTACTAATCCATATTGTAACATCTACCTGAATAGTGTCCAAGTACCAAAAA
 S L V L H I E E A H K L P V K H F T N P Y C N I Y L N S V Q V A K T

CTCATGCAAGCGAAGGCCAAACCCAGTATCGTCAAGACAGTTTCTCTTCAAT
 H A R E G Q N P V W S E E F V F D D

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

25

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 33 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

35

(vi) ORIGINE:

(B) NOM : Peptide P4

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

40

Ala	Pro	Pro	Glu	Pro	Val	Glu	Asp	Arg	Arg	Arg	Val	Arg	Ala	Ile	Leu
1				5				10					15		

Pro	Tyr	Thr	Lys	Val	Pro	Asp	Thr	Asp	Glu	Ile	Ser	Phe	Leu	Lys	Gly
			20					25					30		

45

Asp

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

50

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 10 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

(B) NOM : Peptide P5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

5

Trp Met Trp Val Thr Asn Leu Arg Thr Asp
1 5 10

10 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 28 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

15

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

20

(vi) ORIGINE:

(B) NOM : Peptide P6

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

25

Ile Ser Phe Leu Lys Gly Asp Met Phe Ile Val His Asn Glu Leu Glu
1 5 10 15

Asp Gly Trp Met Trp Val Thr Asn Leu Arg Thr Asp
20 25

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

35

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 31 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

40

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

45

(B) NOM : Peptide P7

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

50

Val Thr Asn Leu Arg Thr Asp Glu Gln Gly Leu Ile Val Glu Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Glu Val Gly Arg Glu Glu Asp Pro His Glu Gly Lys Ile
20 25 30

55

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

60

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 53 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
 5 (v) TYPE DU FRAGMENT: interne
 (vi) ORIGINE:
 (B) NOM : Peptide P8
 10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:
 Pro Pro Glu Pro Val Glu Asp Arg Arg Arg Val Arg Ala Ile Leu Pro
 1 5 10 15
 15 Tyr Thr Lys Val Pro Asp Thr Asp Glu Ile Ser Phe Leu Lys Gly Asp
 20 25 30
 Met Phe Ile Val His Asn Glu Leu Glu Asp Gly Trp Met Trp Val Thr
 35 40 45
 20 Asn Leu Arg Thr Asp
 50

REVENDICATIONS

1. Peptide dérivé de la protéine GAP, capable d'inhiber au moins partiellement l'activité transformante des protéines p21 activées.
- 5 2. Peptide selon la revendication 1 capable d'inhiber au moins partiellement l'activité transformante des complexes p21-GTP-GAP.
3. Peptide selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il est capable de lier la protéine p21, éventuellement complexée au GTP, et en ce qu'il porte une région effectrice rendue non fonctionnelle.
- 10 4. Peptide selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 2 ou d'un dérivé de celle-ci.
5. Peptide selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les peptides P1 à P9.
6. Peptide selon l'une des revendications précédentes modifié par une séquence d'adressage à la membrane de type CAAX où C est une cystéine, A un acide aminé aliphatique et X un acide aminé quelconque.
- 15 7. Peptide capable d'entrer en compétition avec un peptide selon l'une des revendications 2 à 6 pour l'interaction avec sa cible cellulaire.
8. Composé non peptidique ou non exclusivement peptidique capable de moduler l'activité transformante des protéines p21 obtenu par reproduction des motifs actifs des peptides selon les revendications 1 à 7 par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques.
- 20 9. Séquence nucléotidique codant pour un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.
10. Séquence selon la revendication 9 introduite dans un vecteur viral permettant son expression *in vivo*.
- 25 11. Oligonucléotide antisens d'une séquence selon la revendication 9.

12. Procédé de préparation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'on introduit dans une cellule hôte une séquence nucléotidique selon la revendication 9, on cultive cette cellule dans des conditions d'expression de ladite séquence, et on récupère le peptide
5 produit.

13. Composition pharmaceutique ayant comme principe actif au moins un peptide selon l'une des revendications 1 à 7 ou une séquence nucléotidique selon la revendication 9.

14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 caractérisée
10 en ce qu'elle comprend un virus recombinant dans lequel est incorporée une séquence nucléotidique selon la revendication 9.

15. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 caractérisée en ce que le virus est choisi parmi les rétrovirus et les adénovirus.

16. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 13 à 15
15 pour le traitement des cancers.

17. Virus recombinant défectif comprenant une séquence nucléique hétérologue codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7.

18. Virus selon la revendication 17 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus adéno-associé ou du virus de l'herpès.

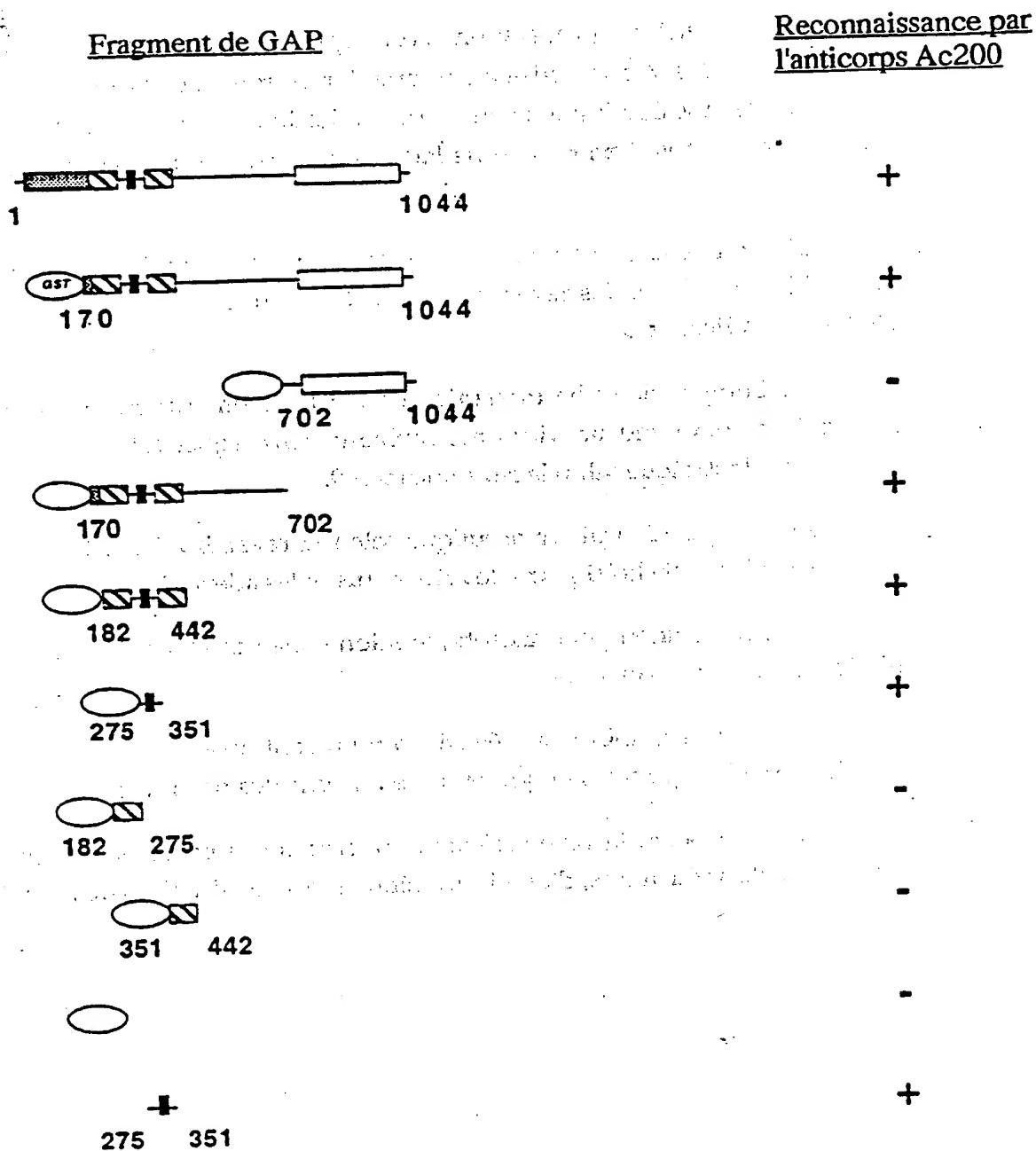


Figure 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT

2/3

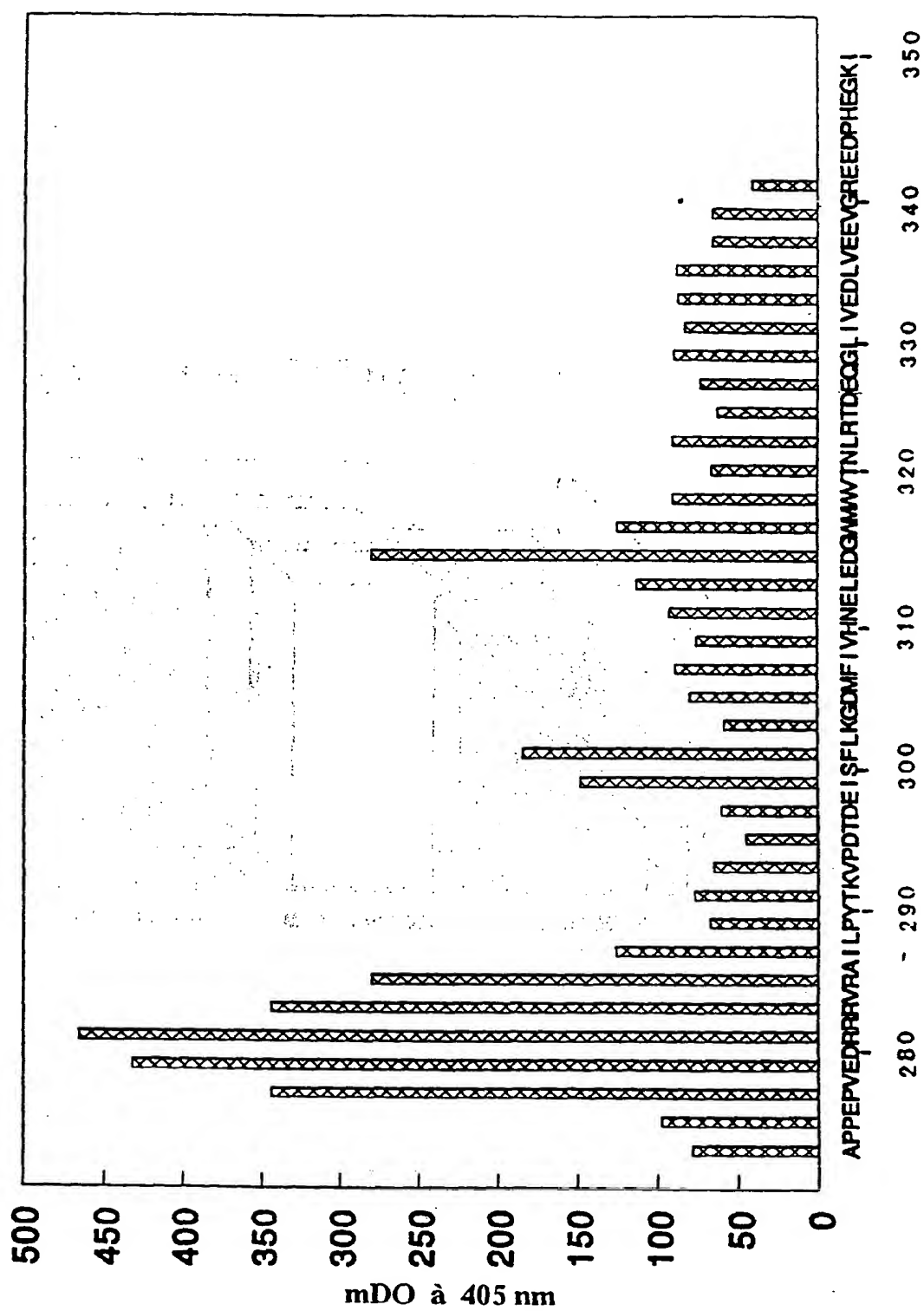


Figure 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT

3/3

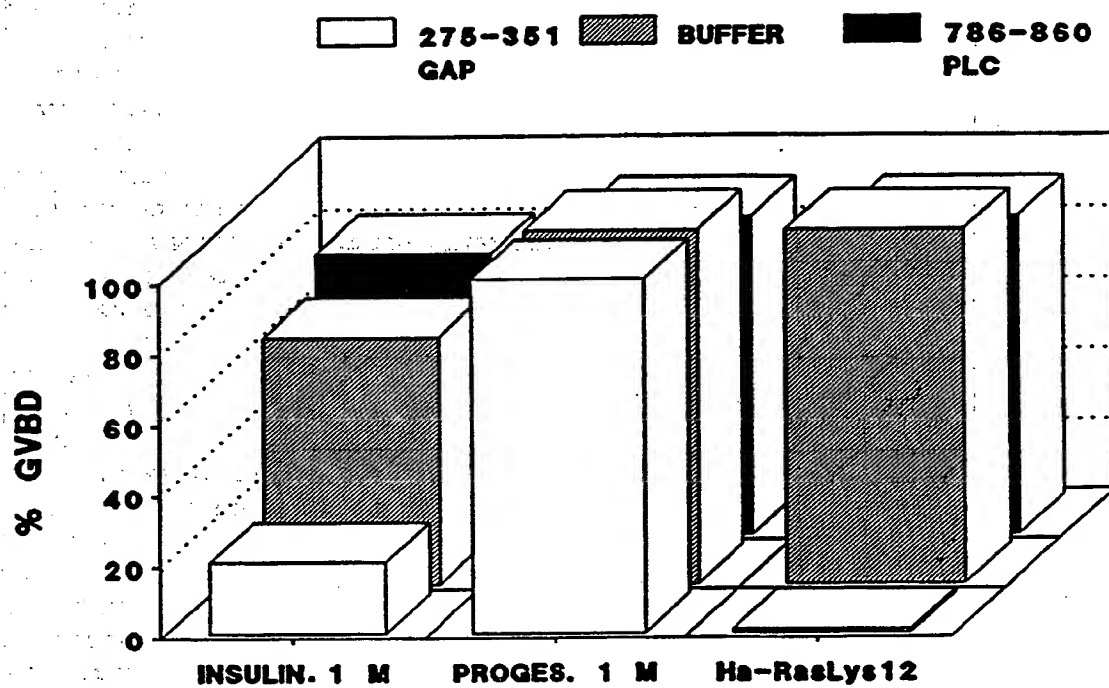


Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte rnational Application No
PCT/FR 93/00772

A. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER
IPC 5 C12N15/12 C07K7/06 C07K7/08 C07K7/10 C07K13/00
A61K37/02 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NATURE. vol. 335 , 1 September 1988 , LONDON GB pages 90 - 93 Vogel, U. et al. 'Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21.' * See the whole document, in particular the fig. 2 *	1-5,9-12
X	WO,A,90 00607 (CETUS CORPORATION, US) 25 January 1990	1-4,7,9, 10,12, 13,16
Y	see the whole document	11
X	WO,A,91 02749 (CETUS CORPORATION, US) 7 March 1991 cited in the application	1-4,7,9, 12,13,16
Y	* The Claims *	11
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * "d" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 January 1994

Date of mailing of the international search report

19. 01. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Nauche, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 93/00772

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EMBO JOURNAL. vol. 10, no. 5, 1991, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1111 - 1118 Saison-Behmoaras, T.; Tocque, B.; Rey, I.; Chassignol, M.; Nguyen Thanh Thuong; Helene, C.; 'Short modified antisense oligonucleotides directed against Ha-ras point mutation induce selective cleavage of the mRNA and inhibit T24 cells proliferation' * Discussion *	11
X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 9, no. 9, 1989, WASHINGTON, DC USA pages 3904 - 3910 Rey, I.; Soubigou, P.; Debussche, L.; David, C.; Morgat, A.; Bost, P. E.; Mayaux, J. F.; Tocque, B.; 'Antibodies to synthetic peptide from the residue 33 to 42 domain of c-Ha-ras p21 block reconstitution of the protein with different effectors' see the whole document	1,2,13
X	WO,A,92 10572 (CETUS CORPORATION, US) 25 June 1992 * The Claims, fig. 5 *	1-5,9-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 93/00772

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9000607	25-01-90	US-A- 5104975	14-04-92
		AU-B- 627764	03-09-92
		AU-A- 4034989	05-02-90
		EP-A- 0466688	22-01-92
		US-A- 5234839	10-08-93
WO-A-9102749	07-03-91	AU-A- 6424790	03-04-91
		CA-A- 2065017	22-02-91
		EP-A- 0491828	01-07-92
		JP-T- 5500506	04-02-93
WO-A-9210572	25-06-92	AU-A- 9135791	08-07-92
		EP-A- 0560924	22-09-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No
PCT/FR 93/00772

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C12N15/12 C07K7/06 C07K7/10 C07K13/00
A61K37/02 C12N15/86

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NATURE. vol. 335 , 1 Septembre 1988 , LONDON GB pages 90 - 93 Vogel, U. et al. 'Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21.' * Le document en entier, en particulier la figure 2 *	1-5,9-12
X	WO,A,90 00607 (CETUS CORPORATION, US) 25 Janvier 1990	1-4,7,9, 10,12, 13,16 11
Y	voir le document en entier	
X	WO,A,91 02749 (CETUS CORPORATION, US) 7 Mars 1991	1-4,7,9, 12,13,16
Y	cité dans la demande * Les revendications *	11
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 Janvier 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19. 01. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nauche, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle

PCT/FR 93/00772

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>EMBO JOURNAL. vol. 10, no. 5, 1991, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1111 - 1118 Saison-Behmoaras, T.; Tocque, B.; Rey, I.; Chassignol, M.; Nguyen Thanh Thuong; Helene, C.; 'Short modified antisense oligonucleotides directed against Ha-ras point mutation induce selective cleavage of the mRNA and inhibit T24 cells proliferation' * Discussion *</p>	11
X	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 9, no. 9, 1989, WASHINGTON, DC USA pages 3904 - 3910 Rey, I.; Soubigou, P.; Debussche, L.; David, C.; Morgat, A.; Bost, P. E.; Mayaux, J. F.; Tocque, B.; 'Antibodies to synthetic peptide from the residue 33 to 42 domain of c-Ha-ras p21 block reconstitution of the protein with different effectors' voir le document en entier</p>	1,2,13
X	<p>WO,A,92 10572 (CETUS CORPORATION, US) 25 Juin 1992 * Les revendications, figure 5 *</p>	1-5,9-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der e Internationale No

PCT/FR 93/00772

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9000607	25-01-90	US-A- 5104975	14-04-92
		AU-B- 627764	03-09-92
		AU-A- 4034989	05-02-90
		EP-A- 0466688	22-01-92
		US-A- 5234839	10-08-93
WO-A-9102749	07-03-91	AU-A- 6424790	03-04-91
		CA-A- 2065017	22-02-91
		EP-A- 0491828	01-07-92
		JP-T- 5500506	04-02-93
WO-A-9210572	25-06-92	AU-A- 9135791	08-07-92
		EP-A- 0560924	22-09-93

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

1. The first part of the report is a general introduction to the subject of the study. It discusses the importance of the study and the objectives of the research. It also provides a brief overview of the methodology used in the study.

2. The second part of the report is a detailed description of the study area. It includes information about the location of the study area, the population of the study area, and the characteristics of the study area. It also discusses the data sources used in the study.

3. The third part of the report is a detailed description of the study results. It includes information about the findings of the study, the conclusions drawn from the findings, and the implications of the findings. It also discusses the limitations of the study and the need for further research.

4. The fourth part of the report is a conclusion and recommendations section. It summarizes the main findings of the study and provides recommendations for future research and policy. It also discusses the significance of the study and the contribution it has made to the field.